

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya mulai Februari hingga Maret 2017.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Spectronic Geneys, seperangkat alat gelas, neraca analitik (*Mettler Toledo AL 204*), inkubator (*Heraeus Type B 5042*), magnetic stirrer (*Ikamag*), penangas air (*Memmert W 200*), jarum ose, pH meter (*Inolab WTW*), kuvet, oven (*Memmert*), shaker (*Edmund Buhler SM 25 24B*), autoklav (*All American Model 20X*), sentrifuse dingin (*Hermle Labortechnik GmbH Siemensstr 25 Wehingen, Type Z326 K*), laminar flow, refrigerator, pemanas listrik (*Janke-Kunkel*), ayakan 3.5 mesh, aluminium foil, kapas steril, dan bunsen.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu memiliki derajat kemurnian pro analisa (p.a), teknis, dan *for microbiology*. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas pro analisis (p.a) antara lain $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, asam dinitrosalisilat (DNS), NaOH 10%, $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, asam asetat glasial, CH_3COONa , HCl, BaCl_2 0,1M, glukosa anhidrat, asam oleat, dextrosa. Bahan kimia yang digunakan dengan kualitas *for microbiology* antara lain urea, pepton, bacto agar, xilan, bentonit, dan kasein. Serta bahan lainnya adalah membran selofan, kentang, klobot jagung, dan akuades.

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Tahap penentuan kadar protein dan aktivitas xylanase

1. Pembuatan substrat xilan, yaitu serbuk klobot jagung
2. Pembuatan media padat
3. Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*
4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum (Biakan aktif)

6. Produksi dan isolasi ekstrak kasar xylanase dari biakan *Trichoderma viride*
7. Penentuan aktivitas xylanase
 - a. Penentuan panjang gelombang maksimum gula pereduksi
 - b. Pembuatan kurva baku gula pereduksi
 - c. Uji aktivitas xylanase
8. Penentuan kadar protein awal
 - a. Penentuan panjang gelombang maksimum dan kurva baku larutan kasein
 - b. Uji kadar protein awal

3.3.2 Tahap penentuan pengaruh pH & Suhu penyimpanan terhadap kestabilan xylanase amobilisasi

1. Amobilisasi xylanase pada matriks bentonit teraktivasi
 - a. Uji aktivitas xylanase amobil
 - b. Uji kadar protein sisa
2. Penentuan Pengaruh pH Terhadap Kestabilan Aktivitas Xilanase Amobil
3. Penentuan Pengaruh Suhu Terhadap Kestabilan Aktivitas Xilanase Amobil
4. Analisa data

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan tepung klobot jagung

Klobot jagung diambil dan dicuci dengan aquades, dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C atau dijemur dibawah terik sinar matahari. Setelah kering klobot jagung dipotong kecil-kecil dan dihaluskan dengan blender. Klobot jagung yang telah halus diayak menggunakan ayakan 150 mesh. Serbuk halus yang lolos ayakan disimpan dan digunakan sebagai induser.

3.4.2 Pembuatan media padat

Media padat yang digunakan adalah Potatoes Dextrose Agar (PDA). Dibuat dengan cara sebagai berikut: kentang yang telah dikupas diambil 20 g, dicuci dengan akuades, dan dipotong kecil kecil. Kemudian dimasukan kedalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan akuades hingga 100 mL, dan dipanaskan hingga mendidih selama 1 jam diatas pemanas listrik. Sese kali ditambahkan akuades agar volume tetap 100 mL. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring dan didapatkan sari kentang. Selanjutnya

kedalam sari kentang ditambahkan dextrose sebanyak 2 g, 1 mL buffer asetat (0,2 M) pH 5, lalu dipanaskan kembali hingga mendidih, dan ditambahkan 1,5 g tepung agar sambil diaduk. Larutan PDA dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 4 mL, ditutup dengan kapas, dan dilapisi kertas coklat. Larutan PDA disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Larutan PDA steril didinginkan pada suhu ruang dengan posisi miring, sehingga diperoleh media padat PDA.

3.4.3 Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride*

Peremajaan biakan murni *Trichoderma viride* dilakukan di dalam laminar air flow. Jarum ose disiapkan, lalu mulut tabung biakan murni *Trichoderma viride*, dan mulut tabung media padat dipanaskan pada nyala api Bunsen agar steril, lalu spora *Trichoderma viride* diambil sebanyak satu mata ose, dipindahkan ke dalam media padat PDA steril secara aseptis. Kemudian, tabung media padat ditutup dengan kapas steril dan kertas coklat, lalu diinkubasi selama 144 jam (6 hari) pada suhu 30°C.

3.4.4 Pembuatan media cair

Sebanyak 0,12 g KH_2PO_4 ; 0,12 g CaCl_2 ; 0,56 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,12 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g pepton, 0,12 g urea; 0,08 g tween-80; 0,4 mL unsur renik, dan 2 g klobot jagung ditimbang dengan neraca analitik. Semua bahan dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan aquades hingga 100 mL, dan dikondisikan pada pH 5 dengan penambahan 1 mL buffer asetat pH 5. Larutan media cair diaduk dan dipanaskan hingga mendidih, lalu ditutup dengan kapas dan kertas coklat. Selanjutnya, disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi.

3.4.5 Pembuatan inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan di dalam laminar air flow. Spora hasil pembiakan murni *Trichoderma viride* yang telah berumur 6 hari diambil dengan jarum ose sebanyak satu mata ose dan disuspensikan dengan menggunakan aquades steril, dipindahkan secara aseptis ke dalam erlenmeyer 250 mL yang sudah berisi 200 mL media cari steril. Kemudian, diinkubasi sampai mencapai pertengahan fase logaritma (36jam) dengan menggunakan shaker.

3.4.6 Produksi dan isolasi ekstrak kasar xilanase

Diambil 65 mL media cair kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan 25 g substrat. Campuran larutan disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, tekanan 15 psi. Kemudian ditambahkan 10 mL larutan inokulum secara aseptis yang dilakukan di dalam laminar air flow. Campuran larutan diinkubasi selama 60 jam pada suhu kamar dan dikocok menggunakan shaker pada kecepatan 100 rpm. Selanjutnya, ditambahkan 30 mL buffer asetat pH 5, lalu disentrifugasi dingin selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar xylanase.

3.4.7 Penentuan aktivitas xilanase bebas

a. Penentuan panjang gelombang maksimum gula pereduksi

Dipipet 1 mL larutan glukosa 300 µg/mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 1 mL larutan buffer asetat 0,2 M pH 5 dan 2 mL reagen DNS. Campuran larutan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dengan air mengalir. Kemudian campuran larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas, dan dikocok sampai homogen. Diukur absorbansinya pada kisaran panjang gelombang 480-550 nm. Larutan blanko yang digunakan adalah aquades dengan perlakuan sama seperti sampel.

b. Pembuatan kurva baku gula pereduksi

Ditimbang 0,15 g glukosa anhidrat, dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL dan dilarutkan dengan aquades secukupnya. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan stok gula 1500 µg/mL. Dipipet sebanyak (2; 4; 6; 6,8; dan 8) mL larutan stok glukosa 1500 µg/mL dan dimasukkan ke dalam 5 buah labu ukur 100 mL berbeda. Lalu, ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok sampai homogen, sehingga dihasilkan larutan glukosa (300, 600, 900, 1000, dan 1200) µg/mL. Setiap konsentrasi larutan glukosa sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu ditambahkan 1 mL buffer asetat pH 5 dan 2 mL reagen DNS pada masing-masing tabung reaksi. Kemudian, semua larutan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit dan didinginkan dengan air mengalir. Masing-masing larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL berbeda, ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok

sampai homogen. Selanjutnya, diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum glukosa dengan menggunakan Spectronic Genesys. Kurva baku dibuat dengan memplotkan data konsentrasi glukosa (ppm) pada sumbu x dan absorbansi pada sumbu y.

c. Uji aktivitas xylanase

Dimasukkan masing-masing 1 mL substrat xilan 1% (b/v) ke dalam tabung reaksi, dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit pada suhu 60°C. Ditambahkan 1 mL xylanase, 1 mL buffer asetat pH 5, dan 1 mL air bebas reduktor. Campuran larutan diinkubasi selama 55 menit pada suhu 60°C, dan kemudian dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Ditambahkan 2 mL reagen DNS ke dalam tabung reaksi, lalu dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Kemudian didinginkan dengan air mengalir, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan akuades hingga tanda batas dan di homogenkan. Di ukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum dengan Spectronic Genesys 20.

Aktivitas xylanase dinyatakan dalam satuan $\mu\text{g/mL} \cdot \text{menit}$. Satu unit aktivitas enzim bebas dinyatakan sebagai 1 μg xilosa yang dihasilkan per menit per mL enzim. Pengukuran aktivitas xilanase bebas dilakukan dengan cara memplotkan nilai absorbansi yang diperoleh pada persamaan kurva baku, sehingga diperoleh konsentrasi gula pereduksi dari hasil hidrolisis xilan oleh xilanase. Berikut persamaan untuk mengetahui satu unit aktivitas enzim:

$$AE = \frac{X \times V \times fp}{p \cdot q} \times \frac{Mr \text{ xilosa}}{Mr \text{ glukosa}}$$

Keterangan: AE = aktivitas enzim ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{menit}^{-1}$)
X = konsentrasi gula pereduksi ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
V = volume total sampel (mL)
fp = faktor pengenceran
p = volume ekstrak xilanase (mL)
q = waktu reaksi (menit)
Mr xilosa = 150,13 g/mol

3.4.8 Penentuan kadar protein awal

a. Penentuan panjang gelombang maksimum dan kurva baku larutan kasein

Diambil 2 mL larutan kasein konsentrasi 5000 µg/mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 8 mL reagen biuret dan 2 mL larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5. Kemudian dikocok dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Diukur absorbansi pada kisaran panjang gelombang 460-640 nm dengan Spectronic Genesys 20.

Kasein ditimbang sebanyak 1 g, dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL, diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer dan ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 0,1 N hingga kasein larut dengan sempurna. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan stok kasein 10000 ppm. Dipipet larutan stok dengan volume (1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 9) mL, dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. Diperoleh larutan (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, dan 9000) µg/mL. Dipipet sebanyak 2 mL masing-masing konsentrasi larutan kasein, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 mL larutan buffer asetat (0,2 M) pH 5 dan 8 mL reagen biuret. Kemudian dikocok dan diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum. Dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi kasein (µg/mL) pada sumbu x dengan absorbansi pada sumbu y.

b. Uji kadar protein awal

Uji kadar protein dilakukan dengan menggunakan reagen Biuret, yaitu 2 mL larutan xylanase dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 8 mL reagen Biuret dan 2 mL larutan kasein 5000 ppm. Campuran larutan dikocok dan diinkubasi selama 30 menit ke dalam penangas air pada suhu 50°C. Diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum dengan Spectronic Genesys 20. Kadar protein awal diketahui dengan cara memplotkan nilai absorbansi pada persamaan kurva baku kasein.

3.4.9 Amobilisasi xylanase pada matriks bentonit teraktivasi

Bentonit terlebih dahulu dikeringkan dalam oven pada temperatur 105 °C. Bentonit yang sudah di oven dimasukkan kedalam Erlenmeyer 250 mL. Kemudian ditambahkan 200 mL larutan HCl

0,4 M dan dikocok dengan shaker pada suhu ruang selama 4 jam dengan kecepatan pengocokan 100 rpm. Kemudian bentonit disaring dengan kertas Whatman no.40 dan dicuci dengan akuades hingga pH filtrat netral. Setelah itu bentonit dikeringkan pada suhu 105°C hingga berat konstan. Bentonit yang telah diaktivasi kemudian dikalsinasi pada suhu 500°C selama 4 jam.

Larutan xylanase sebanyak 4,5 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 25 mL. Kemudian ditambahkan buffer asetat pH 5 sampai volume menjadi 5 mL dan bentonit teraktivasi sebanyak 0,1 gram. Setelah itu, campuran larutan dikocok dengan menggunakan shaker selama 3 jam dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya, filtrat yang diperoleh diuji kadar protein sisanya, dan endapan yang diperoleh diuji aktivitasnya.

a. Uji aktivitas xylanase amobil

Penentuan aktivitas xylanase amobil dilakukan dengan cara: 0,2 mL substrat xilan 1%; 0,2 mL larutan buffer asetat 0,2 M pH 5; 0,1 g xylanase amobil, dan 0,2 mL aquades dicampurkan menjadi satu. Campuran tersebut diinkubasi selama 55 menit pada suhu 50 °C. Kemudian ditambahkan 0,4 mL larutan reagen DNS dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Setelah itu didinginkan pada suhu ruang. Larutan campuran tersebut diencerkan dengan aquades hingga volume 5 mL dan diukur absorbansi larutan menggunakan spectronic geneys pada panjang gelombang maksimum.

b. Uji kadar protein sisa

Uji kadar protein sisa dilakukan dengan cara 2 mL filtrat enzim yang tidak teramobilkan, 2 mL larutan kasein 5000 ppm, dan 8 mL reagen Biuret dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Campuran larutan dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu 50 °C. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan Spectronic Genesys 20. Kadar protein sisa diketahui dengan cara memplotkan nilai absorbansi pada persamaan kurva baku kasein.

3.4.10 Penentuan pengaruh pH penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil

Penentuan kestabilan aktivitas enzim dilakukan dengan cara menginkubasi xilanase amobil pada variasi pH 3, 4, 5, dan 6. Xilanase amobil diambil 0,5 gr dan diatur pada variasi pH 3, 4, 5,

dan 6 dengan ditambahkan buffer asam asetat, kemudian di inkubasi pada suhu 50 °C selama 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hari.

Dilakukan uji aktivitas setiap hari penyimpanan selama inkubasi, dengan ditambahkan substrat xilan 1% sebanyak 1 ml yang telah diinkubasi pada suhu 50 °C selama 15 menit dan didinginkan sampai suhu sama dengan kamar. Ditambahkan buffer asetat pH 6 sebanyak 1 ml, air bebas reduktor 1 ml, diinkubasi pada suhu 50 °C selama 55 menit, dimasukkan kedalam penangas air mendidih selama 15 menit. Ditambahkan 2 ml DNS dan dipanaskan selama 5 menit dalam air mendidih, didinginkan dan dipindahkan ke dalam labu ukur 25 ml dan ditanda bataskan dengan akuades. Sempel dapat diukur kadar gula pereduksinya dengan menggunakan Spectronic Genesys 20.

3.4.11 Penentuan pengaruh suhu penyimpanan terhadap kestabilan aktivitas xilanase amobil

Penentuan kestabilan aktivitas enzim dengan menginkubasi xilanase amobil pada variasi suhu 30, 40, 50, dan 60 °C. Xilanase amobil diambil 0,5 gr, ditambahkan buffer asetat pH 6 dan diinkubasi selama 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hari.

Dilakukan uji aktivitas setiap hari selama inkubasi, dengan ditambahkan substrat xilan 1% sebanyak 1 ml yang telah diinkubasi pada suhu 50 °C selama 15 menit dan didinginkan sampai suhu sama dengan kamar. Ditambahkan buffer asetat pH 6 sebanyak 1 ml, air bebas reduktor 1 ml, diinkubasi pada suhu 50 °C selama 55 menit, dimasukkan kedalam penangas air mendidih selama 15 menit. Ditambahkan 2 ml DNS dan dipanaskan selama 5 menit dalam air mendidih, didinginkan dan dipindahkan ke dalam labu ukur 25 ml dan ditanda bataskan dengan akuades. Sempel dapat diukur kadar gula pereduksinya dengan menggunakan Spectronic Genesys 20.

3.4.12 Analisis data

Data aktivitas enzim xilanase amobil dianalisis dengan program SPSS 23.0 menggunakan uji ANOVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji beda Nyata Jujur (BNJ) 5%.